

药用植物防风组织培养关键技术研究

陈祥梅, 贝丽霞

(黑龙江八一农垦大学 植物科技学院, 大庆 163319)

摘要:以防风成熟种子为材料建立无菌系,研究了不同的外植体、不同基本培养基、不同激素配比对愈伤组织诱导的影响、及不同激素配比对愈伤增殖的影响。结果表明:愈伤组织诱导的最佳基本培养基为MS培养基;诱导率最高的为根,达99.3%,但形成的愈伤组织质地较差,叶的诱导率仅次于根,为84.6%,且质地松散,呈淡绿色,适合进行试验研究,在MS+2,4-D0.6+6-BA0.5培养基上,7d即可见愈伤;正交试验结果表明:6-BA、NAA对愈伤组织的增殖有明显的作用;达显著水平。

关键词:药用植物;防风;组织培养;愈伤组织

中图分类号:Q813.1;R931.71 **文献标识码:**A

Experiments on Tissue Culture of Official Foliage *Sapashnikovia divaricata* Gsch Ischk

Chen Xiangmei, Bei Lixia

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Plant Science College, Daqing 163319)

Abstract: It was obtained aseptic line derived from seed condition of *Sapashnikovia divaricata* (Turcz.) Gsch ischk. It studied affected callus shaped by different explant, different basic medium, different proportion of incretion. Different proportion of incretion and bring up number of days effected proliferated callus. Results showed that be sieving the basic medium; the best basic medium was MS substrate when callus by inducement; the root's inducement percent was highest, it was 99.3%, but it wrought callus quality of a material wasn't good; the leaf's inducement percent was only lower than the root's inducement percent, it was 84.6%, and quality of a material was fall apart, showed pea green, it is fittest to studied. It could appear callus only 7d in MS+2,4-D0.6+6-BA0.5 substrate. Orthogonal plan experimentation Results showed: The 6-BA and NAA had obvious accelerate effect when its callus was proliferated, the proliferated speed was soonest when kept up's number of days was 30d.

Key words: Official foliage, *Sapashnikovia divaricata* (Turcz.) Gsch ischk, Tissue culture, Callus

防风 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.] 为伞形科多年生草本植物,俗称北防风、关防风、东防风等。药用部位是未抽花植株的干燥根。防风含有挥发油、多糖类、无机元素、有机酸、聚乙炔类、色原酮、香豆素、汉黄芩素、腺甙等成分,具有解热镇痛、镇静、抗菌、抗过敏作用,并具有抗肿瘤免疫促进作用及抗凝血作用^[1]。防风药材是以采挖野生防风为主。种源多采自野生种子,2004年,赵敏^[2]的研究指出,防风种子中存在着活性较高的内源抑制物质,致使防风种子发

芽势低。采用组织培养技术具有速度快、成本低,能在短期内繁殖大量种苗,对于保存防风的种质资源,合理开发利用这一药源,满足市场对防风的大量需求具有现实意义。

目前关于防风的研究主要在植物资源、化学成分、中药鉴定、药理作用和临床应用等方面^[3,4],有关防风的体外培养,有人曾用幼叶诱导愈伤组织分化出根芽^[5],也有人用原生质体培养获得再生植株^[6]。但关于植物外源激素生长素和细胞分裂素对防风植株再

基金项目: 黑龙江省研究生创新科研资金重点资助项目(YJSCX2005-08HLJ)。

第一作者简介: 陈祥梅,女,1972年出生,山东日照人,农艺师,黑龙江八一农垦大学在读研究生,研究方向生物工程。获淄博市自然科学成果奖三项;先后参加了省、市重大攻关课题6项。

通讯作者: 贝丽霞,女,1964年出生,教授,硕士研究生导师。研究方向:植物组织培养、生物化学、植物生理学。通信地址:163319 黑龙江省大庆市黑龙江八一农垦大学植物科技学院。Tel: 0459-6818088, E-mail: chenxiangmei127@126.com。

收稿日期: 2006-11-16, **修回日期:** 2006-12-06。

生的影响尚未见详细报道。本实验研究了外源激素对防风组织培养的影响进行了系统的研究,同时为防风优良无性系的繁殖及人工种子制作奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于 2005—2006 年于山东理工大学生命科学院进行。

1.2 材料

供试材料为防风种子(购自黑龙江省西部药材贸易公司)。

1.3 培养基

试用培养基为 MS、B₅ 培养基。培养基均为蔗糖 3%,琼脂 0.65%,pH 值为 5.6~5.8。塑料膜封口。按常规方法配制^[7]分装后,于 121~126℃ 高压灭菌 15min,冷却后备用。

1.4 培养条件

培养室温度为 25± 2℃,在愈伤组织诱导阶段先采用暗培养,4 d 开后转入光下培养,其它阶段均在光下培养,以日光灯为光源,连续光照 12h/d,光强 2000 lx。

1.5 培养

1.5.1 无菌系的建立 取防风种子先在无菌水中浸泡 10~12h 后,小心剥去种皮(避免损伤胚),置于超净工作台上,先用 75%酒精中浸泡 30s 后,倒去酒精,置于 1%NaClO 中浸泡 20min(其间要不停摇动),倒去 NaClO,用无菌水冲洗 5~7 次,接种于琼脂水培养基

上,获得无菌苗。待苗长至 3~4cm 时备用。

1.5.2 愈伤的诱导 取无菌苗的子叶、幼叶、根及茎的 0.5~1.0cm 切段为外植体,接种于不同的愈伤组织诱导培养基上获得愈伤组织。30d 后统计愈伤组织诱导率。培养基如下(激素单位为:mg/L,以下同。):

1. MS
2. MS+2,4-D0.2+ KT0.2+6-BA0.2
3. MS+2,4-D0.5+ KT0.4+6-BA0.4
4. MS+2,4-D0.8+ KT0.6+6-BA0.6
5. B₅+ KT0.6+6-BA0.2
6. B₅+2,4-D0.2+ KT0.4
7. B₅+2,4-D0.5+ KT0.2+6-BA0.6
8. B₅+2,4-D0.8+6-BA0.6
9. MS+2,4-D0.2 +6-BA0.5
10. MS+2,4-D 0.4+6-BA0.5
11. MS+2,4-D0.6 +6-BA0.5
12. MS+2,4-D 0.8+6-BA0.5

1.5.3 愈伤组织的继代培养 将得到的愈伤组织(均取自最佳诱导培养基)切成 0.5~0.8cm 小块后转入不同的继代培养基上继代培养。观察不同激素对比对愈伤组织的生长状况的影响。30d 后统计愈伤组织增殖倍数。试验采用正交试验设计 L16(4³)。试验方案见表 1。

1.6 数据统计

污染率 = (污染的外植体数 / 接种的外植体总数) × 100%

表 1 不同激素浓度对比对愈伤组织增殖的影响

处理号	NAA	KT	6-BA	处理号	NAA	KT	6-BA
1	1(0)	1(0)	1(0)	9	3(0.6)	1	3
2	1	2(0.2)	2(0.8)	10	3	2	4
3	1	3(0.5)	3(1.0)	11	3	3	1
4	1	4(0.8)	4(1.2)	12	3	4	2
5	2(0.2)	1	2	13	4(1.0)	1	4
6	2	2	3	14	4	2	1
7	2	3	4	15	4	3	2
8	2	4	1	16	4	4	3

愈伤组织形成率 = (形成愈伤组织的外植体数 / 接种的外植体数) × 100%

愈伤组织增殖倍数 = (增殖后愈伤组织的重量 / 接入时愈伤组织的重量) × 100%

2 结果与讨论

2.2 愈伤组织的诱导

由表 2 可以看出:两种培养基中含激素的 MS 培养基好于 B₅ 培养基,平均诱导率为 82.1%,愈伤团较大,且均为绿色或淡黄绿色,结构疏松(见图 2);而 B₅

培养基的平均诱导率仅为 50.4%,愈伤均为紫色,但转入 MS 培养基颜色逐渐转绿。可能由于培养基成分不同的作用而导致颜色上的差异^[8]。

从不同的外植体来看,根最容易诱导而得到愈伤,在含激素的 MS 培养基上平均出愈率为 99.3%,但由幼根得到的愈伤组织玻璃化现象较多,所以下一步的试验不用幼根;叶片的出愈率仅次于根,在含激素的 MS 培养基上平均出愈率为 84.6%,且生长情况好,所以叶片是最适宜诱导愈伤的外植体。茎段和下

表 2 不同激素浓度对比对诱导愈伤组织的影响

处 理	根		茎		叶		下胚轴		生长情况
	出愈数	诱导率(%)	出愈数	诱导率(%)	出愈数	诱导率(%)	出愈数	诱导率(%)	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	切口处开始枯黄, 最后死亡
2	38	95	40	100	30	75	13	65	根、下胚轴: +++++, 茎、叶: ++
3	40	100	29	72.5	31	78	14	70	叶: +++++, 其它: +++, 均淡绿色,
4	40	100	40	100	38	95	20	100	根、叶: +, 下胚轴、茎: +++,
5	0	0	0	0	0	0	0	0	干枯, 最后死亡
6	40	100	0	0	7	18	10	50	茎: -, 其它: +, 为淡紫色
7	40	100	0	0	7	18	11	55	茎: -, 其它: +, 淡紫色
8	40	100	23	57.5	17	43	13	65	均+++ , 淡紫色, 致密
9	40	100	26	65	31	78	4	20	淡绿色, ++
10	40	100	29	72.5	32	85	10	50	淡绿色, +++
11	40	100	40	100	40	100	16	80	淡黄绿色, 组织松散, +++++
12	40	100	29	72.5	33	83	9	45	淡绿色, +++

注:根茎叶均接种 40 个外植体,下胚轴接种 20 个外植体。- 无愈伤出现,+ 生长势很弱,++ 生长势弱,+++ 生长中等,++++ 生长良好,+++++ 生长很好。

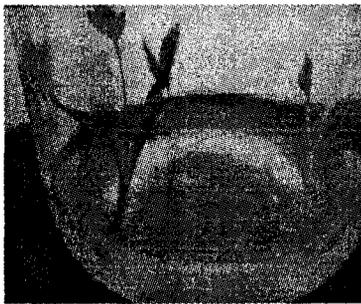


图 1 防风种子瓶内发芽

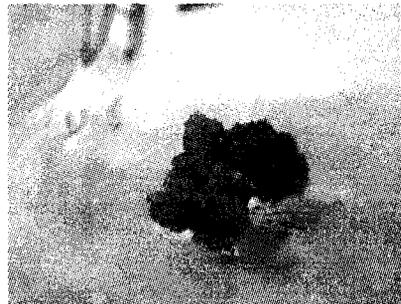


图 2 防风的愈伤组织(处理 8)



图 3 防风的愈伤组织(处理 11)

表 3 愈伤组织增殖培养基的试验结果

试验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
结果	2.04	6.36	9.4	6.24	8.04	5.24	10.76	9.73	13.68	9.48	8.08	9.52	5.04	10.9	7.64	6.52

胚轴的平均出愈率分别为 83.2%、61.4%,形成愈伤时膨大不明显,与叶片相比愈伤团小。

在以上 12 种培养基中,适合根、叶诱导愈伤的培养基是:MS+2,4-D0.6+6-BA0.5 mg/L,叶片在此培养基上 3~4d 叶片膨大,7d 即可见愈伤,出愈率为 100%;茎及下胚轴愈伤诱导的最佳培养基是:MS+2,4-D0.8 +KT0.6+6-BA0.6mg/L;综上所述,选用由叶

产生的愈伤组织进行以下的试验,最佳培养基为:MS+2,4-D0.6+6-BA0.5mg/L。

在以上 12 种培养基中,适合根、叶形成愈伤的培养基是:MS+2,4-D0.6+6-BA0.5mg/L,叶片在此培养基上出现愈伤早,3~4d 即叶片膨大,7d 即可见愈伤,且出愈率为 100%;适合茎及下胚轴产生愈伤的培养基是 MS+2,4-D0.8+KT0.6+6-BA0.6mg/L;综上所述,选

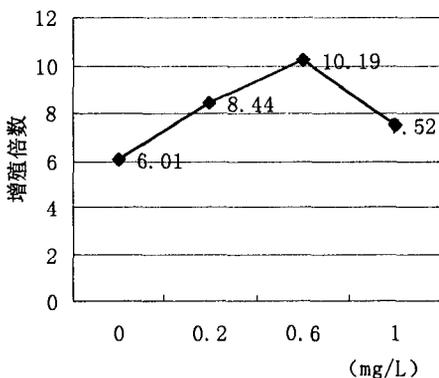


图 4 NAA 对愈伤增殖的影响

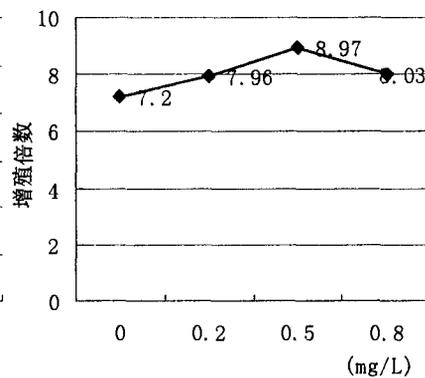


图 5 KT 对愈伤增殖的影响

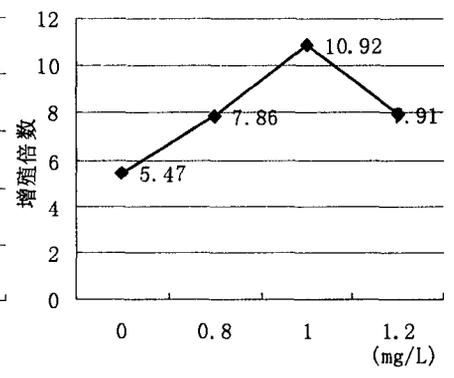


图 6 6-BA 对愈伤增殖的影响

表 4 不同激素对比对愈伤组织增殖影响的方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方差	F	$F_{0.95, n, 99}$
NAA	9.18	3	3.06	11.87**	
KT	1.58	3	0.53	2.04	$F_{0.95}(3,54)=2.78$
6-BA	14.96	3	4.99	19.35**	$F_{0.01}(3,54)=4.16$
剩余	13.92	54	0.26		

注: **表示 0.01 显著水平, *表示 0.05 显著水平。

用由叶产生的愈伤组织进行以下的试验, 最佳培养基为: MS+2,4-D_{0.6}+6-BA_{0.5}mg/L。

2.2 愈伤组织的继代培养

2.2.1 试验结果的直观分析 愈伤组织增殖培养基的试验结果见表 3, 趋势图见图 4-6。

2.2.2 试验结果的方差分析 见表 4。

综合以上方差分析和直观分析可以看出: 6-BA、NAA 对愈伤增殖作用达到极显著水平。KT 对愈伤增殖作用不显著。6-BA 的浓度变化是愈伤增殖的主要因素。6-BA 对愈伤组织增殖的最佳浓度为 1.0mg/L, 增殖倍数达到最大值 10.92 倍, 之后随着浓度的增加增殖倍数开始下降。NAA 对愈伤增殖的最佳浓度为 0.6 mg/L, 增殖倍数达 10.91 倍, 当浓度增加到 1.0 mg/L 时增殖倍数下降为 7.52 倍。正交设计表中处理 9 的增殖倍数达到 13.68 倍, 是 16 个处理中增殖倍数最高的。所以在本试验中叶片愈伤组织增殖的最佳培养基为: MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.6} mg/L。

3 结论

按照细胞全能性学说, 从植物上取下的材料中, 所有的活细胞都能够继续进行分裂, 并能再生出完整植株。但由于受植物遗传特性、生理生态特性以及外界环境条件等的影响, 要使每个细胞的全能性都表现出来, 各种植物的要求都不同^[9,10]。本试验选取防风不同器官, 包括根、茎段、叶、下胚轴, 通过正交试验设计, 结合直观分析、方差分析, 研究防风愈伤组织诱导及增殖的最佳培养基配方。

(1) 以 MS、B₅ 为基本培养基进行愈伤组织的诱导, MS 的诱导率高于 B₅ 培养基, 诱导出的愈伤组织颜色为淡绿色或黄绿色, 愈伤组织长势好于 B₅ 培养基。

(2) 以根、茎段、叶片、下胚轴诱导愈伤组织, 其中以叶片的愈伤组织质地较好, 最佳培养基为 MS+2,4-D_{0.6}+6-BA_{0.5}, 出愈早, 且愈伤团较大, 出愈率为 100%。2,4-D 对愈伤组织的诱导作用虽然明显, 但是长期使用会提高畸形胚的发生率并且降低体细胞胚

的诱导率^[11,12]。所以启动愈伤的时间越短越好, 以减少对细胞的伤害, 在下一步的培养中不使用 2,4-D。

(3) 愈伤组织继代培养中使用 NAA 替代 2,4-D, 通过正交试验, 结果表明: 叶片愈伤组织继代的最佳培养基是: MS+6-BA_{1.0}+NAA_{0.6} mg/L。30d 增殖倍数达 13.68 倍。增殖效果明显。

参考文献

- [1] 高咏莉. 生药防风的化学成分与药理作用研究进展. 山西医科大学学报, 2004, 35(2): 216-218.
- [2] 赵敏. 防风种子中内源抑制物质活性的研究. 中草药, 2004, 35(4): 441-444.
- [3] 马红. 防风近年研究概述[J]. 中草药, 1994, 25(8): 382-440.
- [4] 张贵军, 张艳波, 李影. 我国生药防风近 10 年的研究概况[J]. 时珍国医国药, 1997, 8(1): 73-75.
- [5] 余绍华, 邓佑齐, 杜承忠. 防风的组织培养. 植物生理学通讯, 1985, (5): 39-40.
- [6] 盛世红, 陈惠民. 防风悬浮细胞的原生质体再生植株. 植物学报, 1990, 32, 268-273.
- [7] 曹致义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 95-97.
- [8] 刘庆昌, 吴国良. 植物细胞组织培养. 北京: 中国农业出版社, 2003: 256-262.
- [9] 王清连. 植物组织培养. 北京: 中国农业出版社, 2002: 76-78.
- [10] 柯善强. 植物细胞的遗传全能性与组织培养形态发生控制. 武汉植物学研究, 1987, 5(3): 304-311.
- [11] 奚元龄, 颜昌敬编译. 植物细胞培养手册. 北京: 农业出版社, 1992: 544.
- [12] 李俊明编译. 植物组织培养教程(第二版). 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 26.

致谢: 感谢山东理工大学生命科学院的马汇泉博士和刘涛老师在实验方面的指导和帮助!

(责任编辑: 秦守亮)